



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

TÁCIO CANDEIA LYRA

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA DA AMICACINA MICROENCAPSULADA AO
POLÍMERO POLICAPROLACTONA**

**João Pessoa
2017**

TÁCIO CANDEIA LYRA

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA DA AMICACINA MICROENCAPSULADA AO
POLÍMERO POLICAPROLACTONA**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação
em Odontologia, da Universidade
Federal da Paraíba em cumprimento
às exigências para conclusão.

Orientador: Dr. Lucio Roberto Cançado Castellano

João Pessoa

TÁCIO CANDEIA LYRA

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA DA AMICACINA MICROENCAPSULADA AO
POLÍMERO POLICAPROLACTONA**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação
em Odontologia, da Universidade
Federal da Paraíba em cumprimento
às exigências para conclusão.

Trabalho de conclusão de curso aprovado em 01 / 06 / 2017



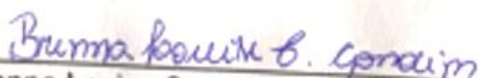
Lucio Roberto Cançado Castellano, Prof. Doutor
Orientador – UFPB



Paulo Rogério Ferreti Bonan, Prof. Doutor
Examinador – UFPB



Jefferson Muniz de Lima, Doutorando- UFPE
Examinador – UFPE



Brenna Louise Cavalcanti Gondim, Doutoranda- UEPB
Examinadora Suplente - UEPB

"Se vi mais longe foi por estar de pé sobre ombros de gigantes."

Isaac Newton

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela oportunidade de viver e poder vivenciar toda paz, felicidade e boas lembranças no que há de melhor nesta passagem terrena.

A minha família por toda compreensão, ajuda e sacrifícios nesta jornada. Não tenho palavras suficientes para dedica-los. Espero um dia poder retribuir muito mais a todos vocês, que merecem tanto. Muito obrigado!!

A Ana Carolina Rodrigues por todo amor incondicional nesta vida, com todos momentos de felicidades, sucesso, apoio, luta e compreensão. Que possamos juntos enfrentar mais dezenas de obstáculos com maestria. Muito obrigado!!

A meu amigo Victor Nicolau por toda amizade e apoio na vida profissional e pessoal. Você é uma peça chave em minha vida. Muito obrigado por toda ajuda e revisão na escrita deste TCC.

Aos Graduandos em Biotecnologia Tarcísio Albuquerque e Camila Félix por fazerem parte deste projeto, sendo pessoas fundamentais onde sem eles, não existiria a pesquisa. Muito obrigado.

Ao Prof. Dr Lúcio Roberto Cançado Castellano, orientador solícito a todos problemas e dificuldades existentes na pesquisa, além de toda diversão e bom humor no laboratório.

Ao Prof. Dr. Paulo Ferreti Bonan, por ter me ajudado a compreender muito do que sei sobre a Estomatologia além de ter me indicado à iniciação científica.

A Prof Dr^a Laudénice Lucena, por todo apoio, ajuda, amizade e ensinamentos na Estomatologia e toda paciência nos estágios extracurriculares no CEO Torre.

A graduada em Odontologia Pâmela Maciel, “dona” do laboratório de microbiologia onde nos ajudou sem medir esforços em todas as dificuldades que presenciamos. Muito obrigado.

A Doutoranda e Técnica do LABIO, Rebeca Tibau Aguiar, peça chave na pesquisa, com toda sua ajuda incansável para colocar todas nossas ideias em prática. Sem você não teríamos realizado a pesquisa com tanto êxito. Muito obrigado.

Ao Doutorando em Odontologia Jefferson Muniz por todo apoio na reta final do projeto, nos ajudando a tabular todos os gráficos e resultados em microbiologia.

Aos amigos da graduação pela motivação diária, pelo qual terei eterna saudade e boas lembranças, especialmente a Matheus André, Lucas Sarmento, Italo Leite, Alan Pablo, Johnys Berton, Helder Domiciano e Philipe Nogueira, os Salafrários.

Ao pessoal do LACEC/LABMIC/LABIO/LAMAB, principais laboratórios de uso para esta pesquisa.

Todos envolvidos no LAMAB em especial ao professor Drº Eliton por ter fornecido a matéria prima e vários equipamentos para viabilizar esta pesquisa.

Aos funcionários do setor de bacteriologia do Hospital Universitário Lauro Wanderley, especialmente a Drª Alba, chefe responsável;

Aos funcionários da Escola Técnica de saúde por sempre estarem solícitos à pesquisa, em especial a Caio.

Aos amigos da vida por todo apoio e compreensão e bons momentos.

Aos envolvidos em nosso projeto direta e indiretamente.

Ao CNPQ E UFPB pela oportunidade.

A todos, meu muito obrigado.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PA – *Pseudomonas aeruginosa*

KP – *Klebsiella pneumoniae*

PCL - Policaprolactona

RNA – Ácido Ribonucleico

KPC - *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase

Spp - Espécies

UTI – Unidade de tratamento intensivo

FDA - *Food and Drugs Administrations*

PLA – Políácido Lático

PEG - Polietilenoglicol

PGLA - Copolímeros do ácido lático e glicólico

MEV – Microscópio eletrônico de varredura

CIM - Concentração inibitória mínima

DCE - Dicloroetano

UV/Vis - Espectroscopia no ultravioleta visível

FTIR - Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier

ATR - Reflectância total atenuada

UFC – Unidades formadoras de colônias

NaCl – Cloreto de sódio

CBM - Concentração Bactericida mínima

µl- Microlitros

µg/mL- Microgramas por mililitro

% - Percentual

°C - Graus Celsius

® - Marca registrada

RESUMO

Bactérias gram negativas tais como *Klebsiella pneumoniae* (KP) e *Pseudomonas aeruginosa* (PA) são comumente encontradas em infecções hospitalares, possuindo eficientes mecanismos de resistências aos antimicrobianos de forma geral. O objetivo deste trabalho foi sintetizar, caracterizar e avaliar ação antimicrobiana do antibiótico amicacina microencapsulada ao polímero policaprolactona (PCL) encapsulando o fármaco Amicacina frente às bactérias PA e KP. A síntese das micropartículas foi realizada através da técnica de emulsificação/evaporação do solvente, sendo estas posteriormente caracterizadas através de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), análise de Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) e a espectroscopia no ultravioleta visível (UV-Vis). A suscetibilidade das bactérias foi avaliada através de testes de disco-difusão e técnica de microdiluição em caldo seguindo protocolo *alarblue*®, indicando o percentual de redução celular e concentração inibitória mínima dos encapsulados. A análise morfológica no MEV caracterizou micropartículas de PCL com média de diâmetro de 2.016 μm , com estruturas integras e uniformes. Em FTIR foi evidenciado gráfico semelhante entre a droga encapsulada e somente o polímero, sugerindo que as partículas são revestidas apenas de PCL, enquanto que o fármaco possivelmente está inserido na partícula. O UV-Vis indicou uma banda de absorção centrada em torno de 281nm e 205nm sendo característica do PCL relacionada com grupos carbonila e a amicacina, respectivamente. Para o encapsulado, a concentração inibitória mínima sob KP foi de 0.0078mg/ml enquanto que fármaco puro 0.000489mg/ml e para PA foi de 0.015mg/ml para a encapsulada enquanto a pura 0.002mg/ml. Na disco difusão as médias dos halos em PA foram de 19,40 mm para o encapsulado ácido e 25,91mm para a droga pura enquanto que em KP 15,2mm e 17,4mm, respectivamente. Pode-se concluir que a síntese das partículas foi efetivada na escala de microcápsulas, sugerindo também que o fármaco esteja inserido na partícula, enquanto a superfície é revestida por PCL. Na microbiologia os encapsulados foram promissores, com atividade antimicrobiana comprovada, necessitando estudos futuros para serem viáveis a prática clínica.

Palavras-chave: Amicacina; Microtecnologia; *Klebsiella pneumoniae*; *Pseudomonas aeruginosa*; Resistência Microbiana a Medicamentos.

ABSTRACT

Gram negative bacteria such as *Klebsiella pneumoniae* (KP) and *Pseudomonas aeruginosa* (PA) are commonly found in hospital infections and they possess efficient mechanisms of antimicrobial resistance generally. The purpose of this study was to synthesize, characterize and evaluate the antimicrobial activity of the microencapsulated antibiotic amikacin towards polymer polycaprolactone (PCL) by encapsulating the drug Amikacin against the PA and KP bacteria. The microparticles were synthesized by solvent emulsification / evaporation technique, then they were characterized by Scanning Electron Microscopy (SEM), Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) and Visible Ultraviolet Spectroscopy (UV-Vis). The susceptibility of the bacteria was evaluated by disc-diffusion tests and microdilution technique according to the alamarblue® protocol, that indicates the percentage of cell reduction and minimum inhibitory concentration of the encapsulates. The morphological analysis in MEV characterized PCL microparticles with a mean diameter of 2,016 μm , with integral and uniform structures. In FTIR a similar graph was shown only between the encapsulated drug and the polymer, it suggests that the particles are coated just with PCL, whereas the drug is possibly inserted into the particle. UV-Vis indicated an absorption zone of inhibition centered around 281nm and 205nm that indicates a characteristic of PCL related to carbonyl groups and amikacin, respectively. Regarding the encapsulation, the minimum inhibitory concentration under KP was 0.0078mg / ml for pure drug 0.000489mg / ml and, as for AP, the CIM was 0.015mg / ml for the encapsulated while the pure was 0.002mg / ml. In the diffusion disc the averages of PA zones of inhibition were 19,40 mm for acid encapsulation and 25.91 mm for pure drug while in KP 15.2 mm and 17.4 mm, respectively. It can be concluded that the synthesis of the particles was effected in the scale of microcapsules, and it suggests that the drug is inserted in the particle while the surface is coated by PCL. In the microbiology the encapsulations were promising, with proven of the antimicrobial activity, but it requires future studies to make the clinical practice possible.

Keywords: Amikacin; Microtechnology; *Klebsiella pneumoniae*; *Pseudomonas aeruginosa*; Drugs Resistance, Microbial.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO DA LITERATURA	13
2.1 MICROORGANISMOS	13
2.1.1 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	13
2.1.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	15
2.2 AMICACINA E TOXICIDADE	16
2.3 SISTEMA DE LIBERAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACO	18
3. OBJETIVOS	21
3.1 OBJETIVO GERAL.....	21
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
4. MATERIAIS E METODOS	22
4.1 SÍNTESE	22
4.2 ANÁLISE MORFOLÓGICA	23
4.3 ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DE INFRAVERMELHO (FTIR)	23
4.4 ESPECTROSCOPIA NO ULTRAVIOLETA VISÍVEL (UV-VIS)	23
4.5 CULTIVO E IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES	24
4.6 TESTE DE MICRODILUIÇÃO	25
4.7 PADRONIZAÇÃO DA DENSIDADE MICROBIANA	26
4.8 MICRODILUIÇÃO EM CALDO	27
4.9 DISCO DIFUSÃO	28
5. RESULTADOS	30
5.1 SÍNTESE	30
5.2 ANÁLISE MORFOLÓGICA	30
5.3 ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO (FTIR)	32
5.4 ESPECTROSCOPIA NO ULTRAVIOLETA VISÍVEL (UV-VIS)	33
5.5 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	34
5.5.1 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	34
5.5.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	37
6. DISCUSSÃO	40
7. CONCLUSÕES	43
REFERÊNCIAS	45

1. INTRODUÇÃO

As infecções hospitalares estão relacionadas com a permanência de um indivíduo em ambiente hospitalar, acometendo principalmente os pacientes imunodeprimidos. *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa* são bactérias Gram-negativas bastante importantes nesses processos, onde possuem alta patogenicidade, sobretudo em enfermos. Estas bactérias apresentam eficientes mecanismos de resistência aos antimicrobianos, desde os medicamentos mais simples, aos mais complexos e de uso restrito em hospitais, dentre eles, os antimicrobianos aminoglicosídeos. (CASTANHEIRA et al., 2014; JENKINS et al., 2016a; MUNOZ-PRICE et al., 2013; POULIKAKOS; FALAGAS, 2013; SOUSA; PEREIRA, 2014; TUMBARELLO et al., 2015).

Os aminoglicosídeos são antibióticos que têm atividade sobre bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, como por exemplo, *Pseudomonas spp*, *Klebsiella spp* e *Staphylococcus spp*. Compreendem uma classe terapeuticamente essencial, cuja utilidade é frequentemente restrita por seu potencial ototóxico e nefrotóxico (POULIKAKOS; FALAGAS, 2013).

Um representante da classe dos aminoglicosídeos, muito utilizado para tratamento de infecções destas bactérias é a Amicacina. Este fármaco possui seu mecanismo de ação efetivado se ligando irreversivelmente a uma ou mais proteínas receptoras do ribossomo bacteriano. Com isso há interferência no processo de transcrição do RNA mensageiro do microorganismo, tendo então, efeito bactericida (DE OLIVEIRA et al., 2012; JENKINS et al., 2016b). Assim como os demais antimicrobianos dessa classe, a Amicacina apresenta a ototoxicidade e a nefrotoxicidade como os principais efeitos adversos (DE OLIVEIRA et al., 2012; KARA et al., 2016).

Com base nestas premissas, surgiu a utilização de micro/nanomateriais para carreamento de drogas, sendo um campo em evidência por proporcionar características interessantes para a medicina, entre elas tornar as substâncias, quando encapsuladas, mais estáveis e solúveis. Isto ocorre devido as microcápsulas ou nanocápsulas poliméricas protegerem o princípio ativo das adversidades, que

sem esse artifício, seria inativado ou teria sua eficácia reduzida. (FREIXO, 2013; JAFARI et al., 2008).

As micropartículas são sistemas micrométricos formados por materiais poliméricos. Nesta, alguns materiais já demonstraram possibilidade de uso médico ou biológico, tais como micro/nanopartículas poliméricas, nanotubos de carbono e micro/nanopartículas metálicas. Estas estruturas são visadas para tratamento de muitas doenças e em terapia anticâncer, em virtude do poder de diminuição dos efeitos colaterais altamente tóxicos dos medicamentos utilizados (MORITZ; MALGORZATA, 2015).

O carreamento de fármacos micro/nanoencapsulados é efetivo para aumentar a biodisponibilidade, minimizar os efeitos colaterais, diminuir a toxicidade e até mesmo os custos (MORITZ; MALGORZATA, 2015). Portanto, a microencapsulação da Amicacina e sua análise de ação antimicrobiana mostram-se como uma importante ferramenta para a melhor eficiência do uso continuado do fármaco na prática clínica cotidiana.

2. REVISÃO DA LITERATURA:

2.1– Microrganismos

De forma geral, as infecções hospitalares são definidas como uma doença causada por microrganismos, que se manifesta durante a estadia de um indivíduo em um determinado ambiente hospitalar. Atualmente, apresentam um sério problema de saúde, apresentando consideráveis taxas de morbidade e mortalidade. Grande parte desse problema está relacionada com a capacidade de resistência que os microrganismos apresentam (DE OLIVEIRA; MARUYAMA, 2008; PADRÃO et al., 2010).

As infecções do trato urinário, pneumonias e a septicemia são as condições mais associadas com as infecções hospitalares. As bactérias mais relacionadas com esses quadros são: *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* (PADRÃO et al., 2010). Outras pesquisas demonstram que os microrganismos do gênero *Enterococcus* também apresentam importância nesses quadros (OTT et al., 2013; SYDNOR; PERL, 2011). Todas as bactérias mencionadas apresentam mecanismos de resistência eficientes, tornando-as, verdadeiros desafios no que diz respeito ao tratamento e escolha do antimicrobiano para um determinado caso (CASTANHEIRA et al., 2014; PADRÃO et al., 2010). A cavidade oral está bastante relacionada com algumas doenças em pacientes hospitalizados, dentre elas, a pneumonia nosocomial que pode ser causada pela *Pseudomonas aeruginosa*, bactéria essa, que pode pertencer a microbiota oral (BATISTA; et al., 2014; LU et al., 2014).

2.1.1 – *Klebsiella pneumoniae*

A *Klebsiella pneumoniae* é uma bactéria Gram-negativa do tipo bacilo, pertencente à família das *Enterobacteriaceae*. São microrganismos anaeróbios

facultativos. É frequentemente indicada como responsável por infecções hospitalares graves e conhecida por apresentar cepas multirresistentes (DÍAZ Q et al., 2004; FIGUERAL; FARIAS, 2014). A *Klebsiella pneumoniae*, como já mencionado, é bastante comum em infecções hospitalares, apresentando altas taxas de mortalidade (70% em neonatais) e acometendo comumente pacientes imunossuprimidos (MUNOZ-PRICE et al., 2013; SANCHEZ et al., 2013; TUMBARELLO et al., 2015).

Essa bactéria pode ser encontrada em uma grande diversidade de ambientes como na água, solo ou em esgotos. A *Klebsiella pneumoniae* não costuma causar problemas em pacientes imunocompetentes, sendo encontrada na microbiota da orofaringe ou nas fezes. Já em imunossuprimidos, com a redução das células do sistema imunológico, as bactérias passam a colonizar o ambiente mais facilmente, provocando as infecções. (BERGAMASCO et al., 2012)

O gênero de bactérias chamado de *Klebsiella* foi primeiramente descrito em 1885, sendo a espécie *pneumoniae* descrita seguidamente. Essa bactéria, naturalmente, costuma apresentar sensibilidade a diversos tipos de antimicrobianos, apresentando resistência intrínseca apenas a algumas penicilinas (como a ampicilina e amoxicilina). Com o uso indiscriminado dos antimicrobianos, algumas cepas dessas bactérias passaram a desenvolver algumas enzimas inativantes, dentre elas a KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase), uma enzima capaz de inativar a grande maioria dos antimicrobianos utilizados na prática hospitalar, sendo comumente chamadas de bactérias multirresistentes. (BERGAMASCO et al., 2012; MARTINS, 2014; PATERSON; BONOMO, 2005; SANCHEZ et al., 2013) Os pacientes imunossuprimidos ou que usem dispositivos invasivos como sondas ou cateter parecem apresentar uma maior susceptibilidade em relação a essas bactérias multirresistentes (FREITAS et al., 2016).

Apesar de a *Klebsiella pneumoniae* ser a bactéria mais relacionada com o desenvolvimento da KPC, outras bactérias da família *Enterobacteriaceae*, são capazes de produzi-la. Outras bactérias como a *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter spp*, *Escherichia coli*, *Salmonella spp* e a *Citrobacterfreundii* e *Serratiaspp* também

são capazes de produzir essa enzima. (FIGUERAL; FARIAS, 2014; PATERSON; BONOMO, 2005).

2.1.2 – *Pseudomonas aeruginosa*

A *Pseudomonas aeruginosa* é uma bactéria gram-negativa, baciliforme e aeróbia. É encontrada frequentemente em ambientes hospitalares, apresentando difícil terapêutica devido a evolução natural do microrganismo, adquirida em vários séculos com diversos mecanismos naturais de resistência. Este microrganismo possui alto poder de disseminação em área hospitalar e infecção no organismo humano, sobretudo em pacientes vulneráveis e em unidades de terapia intensiva (UTI). Há relatos na literatura de isolados deste patógeno em infecções de recém-nascidos, sistema urinário, queimaduras em pele, sistema oftálmico e principalmente no sistema respiratório (DESCHAGHT et al., 2011; MILLAN et al., 2012; SILVA FILHO et al., 2013; SOUSA; PEREIRA, 2014). A cavidade oral apresenta uma ampla diversidade bacteriana, dentre elas, a *Pseudomonas aeruginosa* pode ser isolada com certa frequência, não havendo riscos para pacientes saudáveis. No entanto, pode causar infecções oportunistas em indivíduos debilitados, como idosos e imunodeprimidos. (BATISTA; et al., 2014; LIMA et al., 2015)

O tratamento de infecções de *p. aeruginosa* se torna complexa na prática clínica, por diversas circunstâncias. Esta bactéria possui lipossacarídeos, flagelos e adesinas que influenciam diretamente na resistência intrínseca aos antimicrobianos, além das proteínas porinas presentes em sua parede celular, que eliminam o antibiótico da célula antes do mesmo efetivar seu efeito. Outro fator contribuinte para esta dificuldade se dá pela grande resistência aos antisépticos e desinfetantes químicos, tendo em sua composição compostos quaternários de amônio, fenol e hexaclorofeno, muito usado para limpeza de ambientes diversos (CASTANHEIRA et al., 2014; CHATTERJEE et al., 2016).

As principais fontes de contágios podem ser constituídas pela própria cama do paciente, água, flores, grades da cama, ou até mesmo em contato com outras

peessoas, já que este microrganismo é comensal. (BROWN; CORNFORTH; MIDEO, 2012; CASTANHEIRA et al., 2014)

2.2 – Amicacina e Toxicidade

Para o tratamento das infecções bacterianas são utilizados antimicrobianos, agentes bastante utilizados na prática médica e odontológica. São medicamentos que apresentam a capacidade de inibir o crescimento de determinados microrganismos. Essa classe de medicamentos está dividida em diversos grupos, cada um com suas peculiaridades e mecanismos de ação próprios. Dentre os grupos de antimicrobianos, os mais prescritos na prática clínica são: as penicilinas, cefalosporinas, macrolídeos e os aminoglicosídeos. (ANDRADE, 2014; DRAWZ; BONOMO, 2010)

A amicacina é uma droga pertencente ao grupo dos aminoglicosídeos, é bastante utilizada em UTIs (Unidade de Terapia Intensiva) para pacientes com infecções graves provocadas por bactérias Gram-negativas aeróbias. Mesmo com o aumento da resistência das bactérias hospitalares aos antimicrobianos, a amicacina continua sendo bastante utilizada, principalmente em pacientes com suspeita de infecções por *Pseudomonas aeruginosa* (MARSOT et al., 2016; XIE; TALASKA, 2011). O termo “aminoglicosídeo” está relacionado com a composição das moléculas do fármaco, pois, a mesma é constituída por dois ou mais aminoaçúcares que são unidos por uma ligação glicosídica. (OLIVEIRA; CIPULLO; BURDMANN, 2006)

Os aminoglicosídeos são antimicrobianos de largo espectro bastante utilizados em países em desenvolvimento, pois, além de eficazes e bem estudados, apresentam baixo custo. A estreptomicina foi o primeiro antimicrobiano aminoglicosídeo conhecido. Foi obtida em 1944 a partir do fungo *Streptomyces griseus*. A partir desse, outros aminoglicosídeos foram sendo introduzidos no mercado, hoje em dia, os mais utilizados na prática médica são a amicacina, gentamicina, neomicina, tobramicina e a própria estreptomicina (DE OLIVEIRA et al., 2012; JENKINS et al., 2016b; OLIVEIRA et al., 2011; VELISSARIS et al., 2014). O

grupamento “amina” está presente em todos os antimicrobianos desse grupo, conferindo-lhes sua ação contra as bactérias gram-negativas. Em contrapartida, o mesmo grupamento “amina” também é responsável pela nefrotoxicidade e ototoxicidade, que são bastante conhecidas desses antimicrobianos (JENKINS et al., 2016b; LEIS; RUTKA; GOLD, 2015; VELISSARIS et al., 2014).

Os aminoglicosídeos são pouco absorvidos (ou não absorvidos) no intestino, reto e na cavidade oral, sendo mais aproveitados quando são administrados por via parenteral, podendo ser utilizados por via intramuscular ou endovenosa. A excreção do medicamento ocorre nos rins, a partir da filtração glomerular (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012). Em relação à indicação, os aminoglicosídeos são utilizados no combate a diversas infecções, sendo algumas: Endocardite bacteriana, tuberculose, Infecções no trato urinário, Otite externa e infecções hospitalares. Sendo a Amicacina, a droga mais eficaz em infecções hospitalares graves (AVENT et al., 2011; MULLER et al., 2016). Infecções graves como a Fascíte Necrosante cervicofacial, causada por bactérias presentes na cavidade oral, também são tratadas com o uso dessa classe de antimicrobianos (VALLIM et al., 2016).

Os antimicrobianos desse grupo são mais eficazes contra bactérias Gram-negativas, dentre elas, as do gênero *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Pseudomonas* spp. e *Acinobacter* spp. Apenas disso, algumas bactérias gram-positivas também podem ser susceptíveis aos aminoglicosídeos, principalmente as bactérias do gênero *Staphylococcus* spp. e *Enterococcus* spp. Esses antimicrobianos não apresentam efeito algum em microrganismos anaeróbicos ou anaeróbicos facultativos. (AUTO; CONSTANT; CONSTAT, 2008; OLIVEIRA; CIPULLO; BURDMANN, 2006)

A Amicacina é um antimicrobiano semissintético que foi produzido pela primeira vez no Japão em 1972. Esse medicamento apresenta o maior espectro de ação de todos os aminoglicosídeos. Isso ocorre por que a Amicacina não é afetada pela maioria das enzimas que inativam os aminoglicosídeos (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012). O mecanismo de ação da Amicacina ocorre por meio da ligação irreversível a uma ou mais proteínas receptoras na subunidade 30S do ribossomo bacteriano, interferindo em vários mecanismos no processo de

transcrição do RNAm. Com isto, se resulta na terminação prematura da cadeia ou provocando a incorporação de um aminoácido incorreto no produto proteico. Sendo assim, é considerada uma antimicrobiano de efeito bactericida (DE OLIVEIRA et al., 2012; JENKINS et al., 2016b).

Sua utilidade é frequentemente restrita por trazer diversos problemas ao paciente, principalmente pelo seu potencial ototóxico e nefrotóxico. A ototoxicidade dessa classe se deve ao dano ocasionado através da ação química do antibiótico sobre o VIII par de nervos cranianos (nervo vestibulococlear ou estatoacústico), causando alterações no equilíbrio (ramo vestibular) ou de audição (ramo coclear). Os danos no vestíbulo ocorrem por meio da destruição do labirinto vestibular. Em ambos os casos os danos podem ser temporário ou permanente, dependendo da quantidade administrada e do tempo de uso do antimicrobiano aminoglicosídeo (DE OLIVEIRA et al., 2012; JENKINS et al., 2016b; KARA et al., 2016).

Acredita-se que a nefrotoxicidade ocorra devido à ligação das moléculas do medicamento com receptores específicos no túbulo proximal do rim, com isso, a molécula do aminoglicosídeo que deveria ser excretada, sofre endocitose e passa a se acumular nos lisossomos das células renais, induzindo alterações morfológicas. Grande parte dos casos de Insuficiência Renal Aguda nefrotóxica são causados pelo uso de antibióticos, sendo os aminoglicosídeos, os mais relatados (KOCYIGIT et al., 2015; MODONGO et al., 2015). Outros efeitos colaterais citados na literatura incluem: complicações neuromusculares e reações de hipersensibilidade (AUTO; CONSTANT; CONSTAT, 2008).

2.3 – Sistema de Liberação Controlada de Fármaco

Deste modo, tecnologias como o micro/nanoencapsulamento se tornam essencial como instrumentos adjuvantes e coadjuvantes para maior eficácia do fármaco, tais como menor toxicidade, maior direcionamento do fármaco ao patógeno e consequentemente melhor tratamento de infecções bacterianas (ASSIS et al, 2012).

A microtecnologia é uma ciência que visa à obtenção e o estudo das propriedades físicas, químicas e biológicas de partículas com tamanhos micrométricos. A partir desses estudos, essas partículas podem ser empregadas de diversas formas e aplicadas em múltiplas áreas, como na indústria alimentícia, cosmética e farmacêutica. As micropartículas são sistemas micrométricos (1-1000 μm) desenvolvidas a partir de polímeros biodegradáveis ou não, sendo sua síntese alvo de diversos estudos desde as décadas de 80 e 90. (ASSIS et al., 2012; SAHOO; PARVEEN; PANDA, 2007).

Os polímeros que constituem as nano/micropartículas, mais utilizados no processo de síntese e nano/microencapsulamentos, são os do tipo biodegradáveis e aprovados pela *Food and Drugs Administrations* (FDA). Dentre eles, podemos citar os derivados do ácido láctico (PLA), do ácido glicólico (PGA), polietilenoglicol (PEG), derivados da policaprolactona (PCL) e os copolímeros do ácido láctico e glicólico (PGLA) (MARTINEZ-GUTIERREZ et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2014; SEVERINO et al., 2011). Dentre esses polímeros, destaca-se o PCL, poliéster alifático, que tem sido utilizado na síntese de nanocarreadores de fármacos, por possuir boa biodegradabilidade, biocompatibilidade, ausência de toxicidade, degradação lenta e não liberar resíduos ácidos. A degradação lenta admite a liberação controlada do fármaco, aumentando assim, a sua meia-vida. Com isto, se reduz a frequência de administração e, conseqüentemente, aumentando a motivação e adesão do paciente à terapia medicamentosa (KALITA et al., 2015; KHODIR et al., 2013; MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010)

De acordo com o processo de sintetização e metodologia empregadas, as nanopartículas podem ser denominadas de microcápsulas ou microesferas. As microesferas são constituídas de matriz poliméricas onde a droga está dispersa por toda a partícula. Já as microcápsulas são constituídas de um sistema reservatório na qual uma cavidade oca ou oleosa está rodeada por uma fina parede polimérica onde o fármaco está localizado (ASSIS et al., 2012; THAKKAR; MHATRE; PARIKH, 2010).

O crescimento dos estudos da área farmacêutica associados com as nano/micropartículas tem sido cada vez maior. Os usos de partículas de tamanhos

micrométricos estão sendo usados como carreadores para determinadas drogas com o objetivo de diminuir a toxicidade do medicamento, reduzir a dose eficaz, direcionamento da droga para seu local de ação, evitar degradação, melhorar sua liberação ou fornecer uma liberação controlada. (ASSIS et al., 2012; GILJOHANN et al., 2010; GUZMAN; DILLE; GODET, 2012; KALITA et al., 2015; PRABHU; POULOSE, 2012). Os carreadores nano/microparticulados também facilitam a absorção celular, e, apresentando um desempenho significativamente melhor em comparação a medicação pura (FREIXO, 2013).

Quando incorporado ou encapsulado, o princípio ativo a ser utilizado adquire uma maior estabilidade e solubilidade, pois, a cápsula polimérica protege a substância de situações hostis como mudança de pH, temperaturas elevadas e na presença de solventes orgânicos. Com isso, a droga que anteriormente eram mal absorvidas devido a essas condições adversas, passa a melhor absorvida e, conseqüentemente, ter uma melhor eficácia (FREIXO, 2013; JAFARI et al., 2008).

Por ser uma área ainda relativamente nova, o estudo dos malefícios das nano/micropartículas para a saúde humana ainda não estão bem esclarecidos, alguns autores afirmam que por essas partículas apresentarem uma área superficial aumentada, podem apresentar efeitos tóxicos não tão evidentes como na substância original (BULCÃO et al., 2013; LINKOV; SATTERSTROM; COREY, 2008; LOVE et al., 2012). Outros problemas citados na literatura são: penetração nas vias respiratórias das partículas com alojamento nos pulmões e distribuição para outros sítios a partir da corrente sanguínea e alterações em nível celular (AHAMED; ALSALHI; SIDDIQUI, 2010; ASSIS et al., 2012).

Com base nestas premissas, o nanoencapsulamento está sendo estudado devido a sua característica de potencializar a eficiência do medicamento, direcionando o fármaco para o local de ação no organismo, evitando sua degradação e permitindo o uso de uma concentração menor da droga, diminuindo assim conseqüentemente, sua toxicidade (KALITA et al., 2015).

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL:

Sintetizar, Caracterizar e avaliar a atividade antimicrobiana do fármaco Amicacina encapsulada em micropartículas de PCL frente as bactérias *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Estabelecer tamanho médio dos encapsulados em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)
- Determinar os grupos funcionais e identificação química das amostras através da espectroscopia na região de infravermelho, comparando micro/nanoencapsulados com o polímero puro.
- Verificar comprimento de onda e espectros visíveis ultravioleta através da espectroscopia no ultravioleta visível UV/Vis, comparando micro/nanoencapsulados com o fármaco puro.
- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) da Amicacina micro/nanoencapsulada em PCL com pH Neutro e Ácido, além da droga pura, frente as *Pseudomonas Aeruginosa* e *Klebsiella Pneumoniae*,
- Avaliar potencial inibitório através da técnica de disco-difusão entre a droga pura e micro/nanoencapsulados.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 SÍNTESE

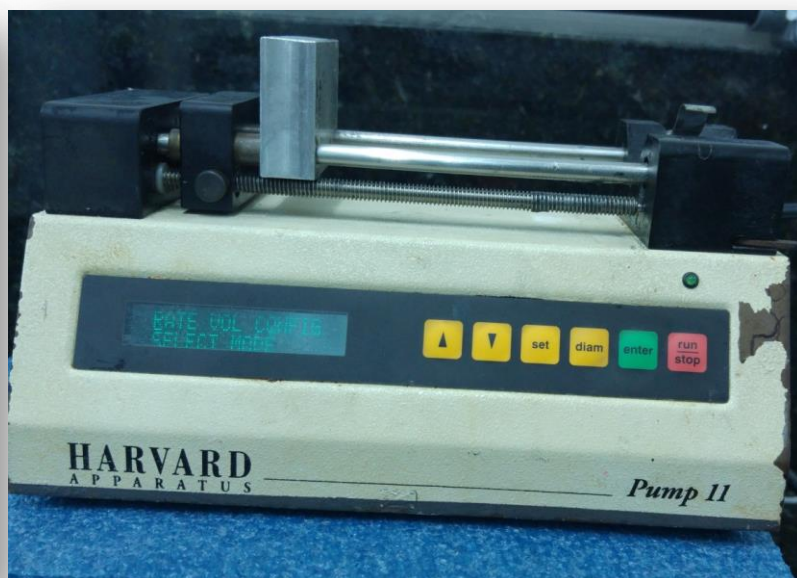
Para preparo da síntese da amicacina com o PCL, utilizou-se aproximadamente 148,5 mg de PCL que foram dissolvidos em 27 ml de dicloroetano (DCE) por agitação magnética (Fig.1) a 37° C. Após a completa solubilização, adicionou-se 72 µl de polissorbato 80 (Tween), aguardando 15 min em agitação. Em seguida, adicionou-se 1,35 ml do fármaco sendo aguardado 15 min para absoluta solubilização. Utilizando uma seringa de 20 ml e uma agulha de tamanho 13 x 4,5 mm, gotejou-se a solução em 53 ml de água destilada sob agitação, utilizando uma bomba injetora (Fig. 2) numa vazão de 330 µl/min. Para completa evaporação do solvente, foi colocada solução em agitação magnética por 12 horas.

Figura 1:



Agitador Magnético

Figura 2:



Bomba Injetora modelo Harvad Pump 11

4.2 ANÁLISE MORFOLÓGICA

A análise morfológica da partícula de PCL encapsulando com o fármaco foi realizada por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Para isso, adicionou-se aproximadamente 10 µl da substância em uma camada do mineral mica, sendo posteriormente armazenada em dissecador para evaporação completa dos líquidos, para leitura em microscopia. As amostras foram previamente metalizadas com uma camada de ouro (modelo FEI Quanta 450). A análise por MEV foi realizada no equipamento carried FEI Quanta modelo 450 a 5 kV. A medição das partículas foi realizada pelo software ImageJ.

4.3 ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DE INFRAVERMELHO (FTIR)

Para a análise do FTIR foi utilizado um espectrofotômetro de Marca Shimadzu, modelo IR-Prestige 21. As condições adotadas para as análises foram: Região 4000 a 600 cm^{-1} ; resolução 4 cm^{-1} ; 20 varreduras; modo de transmitância. Os ensaios foram realizados com acessório de Reflectância Total Atenuada (ATR). Foi realizado a espectrofotometria da do PCL + Amicacina e o PCL+ solvente dicloroetano (DCE), afim de comparação. Esta análise permite a identificação química, a determinação de grupos funcionais, o estudo estrutural e conformação de moléculas e macromoléculas, geralmente orgânicas, que permitem a identificação de componentes de uma amostra. As amostras encontravam-se sólidas, previamente liofilizadas.

4.4 ESPECTROSCOPIA NO ULTRAVIOLETA VISÍVEL (UV-Vis)

Os espectros visíveis ultravioletas foram registrados utilizando o equipamento UV-Vis (espectroscopia na gama de UV / VIS, equipamento Perkin Elmer, Lambda

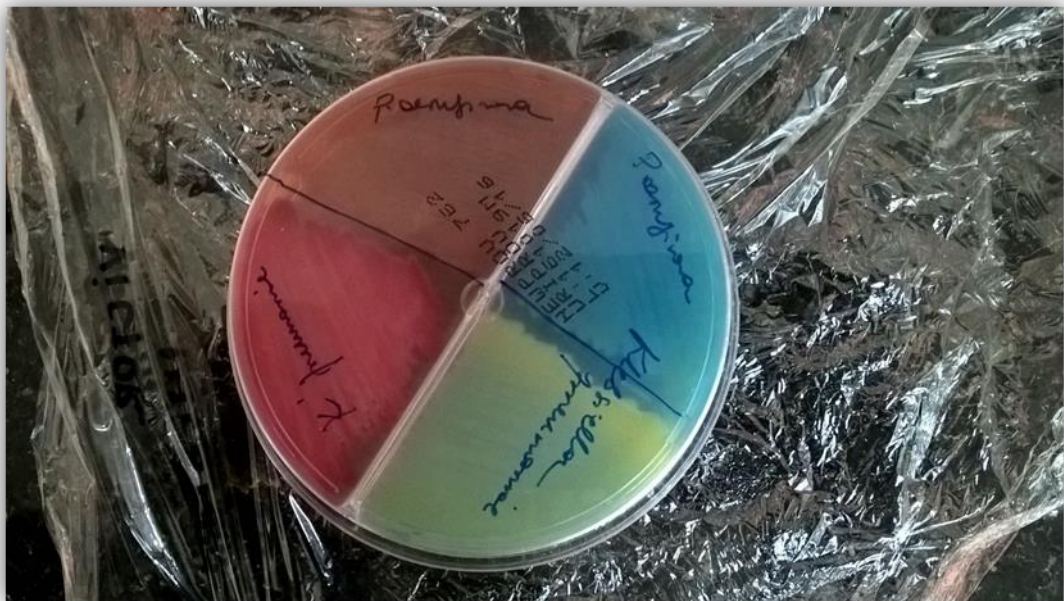
25) para a preparação da curva de calibração, realizadas com 380nm de comprimento de onda.

Foi realizada leitura do fármaco diluído em água, afim de obter o seu comprimento de onda correspondente, para futura comparação. Posteriormente, foi realizado a leitura da solução de policaprolactona (PCL) encapsulando a amicacina, tendo como referência a solução de PCL pura.

4.5 CULTIVO E IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES:

As amostras de *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa* (Figura 3) foram coletadas de cepas selvagens obtidas pelo serviço de bacteriologia do Hospital Universitário Lauro Wanderley. Posteriormente, em triplicata, foram cultivadas em meio ágar Mueller Hinton. Em seguida, as placas foram incubadas a 37 ° C em estufa bacteriológica (ELETROlab) (Figura 4) e examinadas após 24 horas, a fim de obter o crescimento das bactérias. A média das unidades formadoras de colônia das espécies foram obtidas através da quantificação das placas de ágar Mueller Hinton com crescimento positivo.

Figura 3:



Placa de Petri contendo linhagens da bactéria *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae*.

As colônias obtidas em meio ágar Mueller Hinton foram isoladas e identificadas presuntivamente baseadas na morfologia das colônias. Em seguida, as unidades formadoras de colônias (UFC) foram estocadas em tubos de criogenia (2mL) em caldo Mueller Hinton e glicerol a 2°C, objetivando, garantir os isolados para, posteriormente, verificar a suscetibilidade microbiana frente ao antibiótico Amicacina e esta nanoencapsulada.

Figura 4:



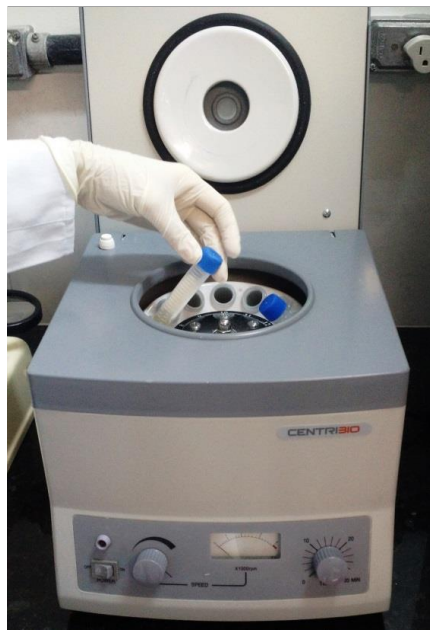
Estufa bacteriológica (ELETROlab) a 37 graus Celsius.

4.6 TESTE DE MICRODILUIÇÃO

Os tubos de criogenia foram descongelados a temperatura ambiente. Em seguida, 50 µL de cada estoque foram semeados em 5mL (5000 µL) do meio caldo Mueller Hinton em tubos Falcons com tampas previamente esterilizados e homogeneizados em Vórtex (FANEM®). Em seguida, cada tubo semiaberto foi levado para a estufa bacteriológica (ELETROlab), durante 24 horas a 37°C. Após 24h do cultivo, os tubos foram centrifugados por 15 minutos na velocidade 2.500 rotações por minuto, em aparelho centrifugador (CENTRIBIO) (Figura 5). Os

sobrenadantes foram descartados e a cada tubo foi acrescentado 5mL de solução salina (NaCl 0,9%) e homogeneizado.

Figura 5:



Aparelho Centrifugador (CENTRIBIO)

4.7 PADRONIZAÇÃO DA DENSIDADE MICROBIANA

As suspensões de bactérias preparadas em solução salina (NaCl a 0,9%) foram padronizadas com valores de absorbância entre 0,080 a 0,100 através de espectrofotômetro (GLOMAX MULTI, Promega) (Fig. 6) emitindo comprimento de onda de 530 nm, resultando na concentração de 5×10^8 UFC (unidades formadoras de colônias/mL, equivalente a 0,5 da Escala de MacFarland (NCCLS, 2003).

Figura 6:



Espectrofotômetro GLOMAX MULTI, Promega

4.8 MICRODILUIÇÃO EM CALDO

A suscetibilidade das espécies bacterianas foi avaliada através da técnica da microdiluição em caldo (NCCLS, 2003). Em placas de microdiluição de 96 poços foram aliquotadas 100 μ L de caldo Mueller Hinton nos orifícios da placa. Em seguida, 100 μ L do antibiótico nanoencapsulado foram transferidos para o primeiro poço e diluídos seriadamente a partir da retirada de uma alíquota de 100 μ L da cavidade mais concentrada para a cavidade sucessora, seguindo até o último poço. O ensaio foi realizado em triplicata.

O antibiótico nanoencapsulado também foi neutralizado com hidróxido de sódio e realizado o mesmo teste para avaliar sua eficácia em pH neutro. Em seguida, foram adicionados a cada poço 100 μ L das suspensões na concentração de 5×10^5 UFC/mL (NCCLS, 2003). Paralelamente, foram realizados os controles de viabilidade das cepas (controle de crescimento, 100 μ L de meio Mueller Hinton e 100 μ L de inóculo) e de esterilidade do meio (100 μ L de meio) e da droga (100 μ L de meio e 100 μ L da droga). Após, as placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas.

Para a leitura da placa foi utilizado o protocolo AlamarBlue®, que indica o percentual de redução celular utilizando valores de absorbâncias obtidos através do corante Resazurina sódica (Sigma-Aldrich), como indicado no kit. Para isto, após o

período de incubação foram adicionados 20 µL de Resazurina sódica a cada poço, e durante 2 horas, em intervalos de 30 e 30 min, as placas foram lidas em espectrofotômetro em dois comprimentos de ondas distintos (560 nm e 600nm). Os dados foram tabulados em Excel e realizado os cálculos indicados no protocolo alamarBlue® (Fig. 7).

Figura 7:

$$\text{Porcentagem de redução alamarBlue®} = \frac{(O2 \times A1) - (O1 \times A2)}{(R1 \times N2) - (R2 \times N1)} \times 100$$

Where: O1 = molar extinction coefficient (E) of oxidized alamarBlue (Blue) at 570nm*
 O2= E of oxidized alamarBlue at 600nm*
 R1 = E of reduced alamarBlue (Red) at 570nm
 R2= E of reduced alamarBlue at 600nm
 A1 = absorbance of test wells at 570nm
 A2 = absorbance of test wells at 600nm
 N1 = absorbance of negative control well (media plus alamarBlue but no cells) at 570nm

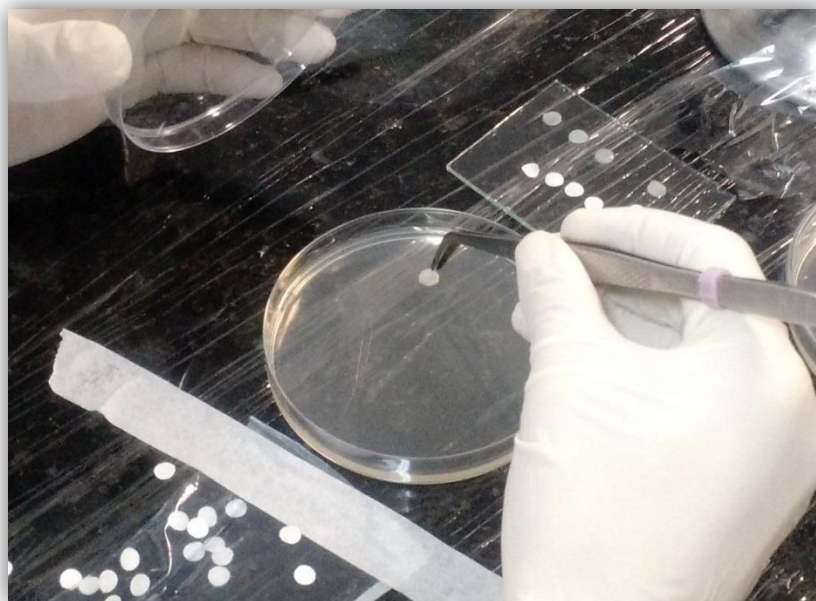
Protocolo alamarBlue®

4.9 DISCO DIFUSÃO

A atividade antimicrobiana *in vitro* foi avaliada por meio da técnica de difusão em Agar. Foram utilizadas placas de petri de plástico estéreis preparadas com 20 mL do meio de cultura de Mueller-Hinton agar e 400 µL do inóculo de *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*, espalhado com alça de inoculação estéril, após solidificação completa do meio. O inóculo foi previamente padronizado como descrito acima. Em seguida, após a placa secar, posicionaram-se discos de papel

estéreis (Fig. 8) embebidos com 10 μ L das substâncias testes, em triplicata. Para o controle positivo foram utilizados 10 μ L do Amicacina 250mg/mL, e para o controle negativo utilizou-se PCL e dicloroetano. As placas foram armazenadas em estufa bacteriológica à 37°C por 24 horas para crescimento dos microorganismos. Após a incubação, diâmetros de inibição ao redor dos espécimes foram medidos em cinco pontos distintos utilizando-se o software ImageJ.

Figura 8:



Posicionamento dos discos em placa de petri.

5. RESULTADOS

5.1 SÍNTESE

A síntese dos encapsulados resultou em um líquido homogêneo e inodoro (fig. 9) demonstrando completa solubilização do polímero e fármaco além de total evaporação do solvente dicloroetano (DCE), utilizado no experimento. As amostras alcançaram aspecto de turbidez, sendo característico das substâncias nano/microencapsuladas e posteriormente distribuídas em tubos cônicos tipo Falcon 50ml. A concentração final do encapsulado consistiu em aproximadamente 16,835 mg/ml, onde em contrapartida o fármaco puro possui concentração de 50mg/ml, onde este foi posteriormente diluído para obter concentração igualada ao encapsulado, para que com isto, nivelasse comparações futuras.

Figura 9:



Amostras dos encapsulados dispostos em tubos cônicos tipo Falcon 50ml

5.2 ANÁLISE MORFOLÓGICA

Verificou-se formação de micro e nanopartículas de PCL (Fig. 10 e 11) encapsulando o fármaco amicacina, com formas bem delimitadas além de estrutura íntegra e uniforme. A média de diâmetro obteve o valor de aproximadamente 2.016 μm , sendo mensuradas através do programa ImageJ.

Figura 10:

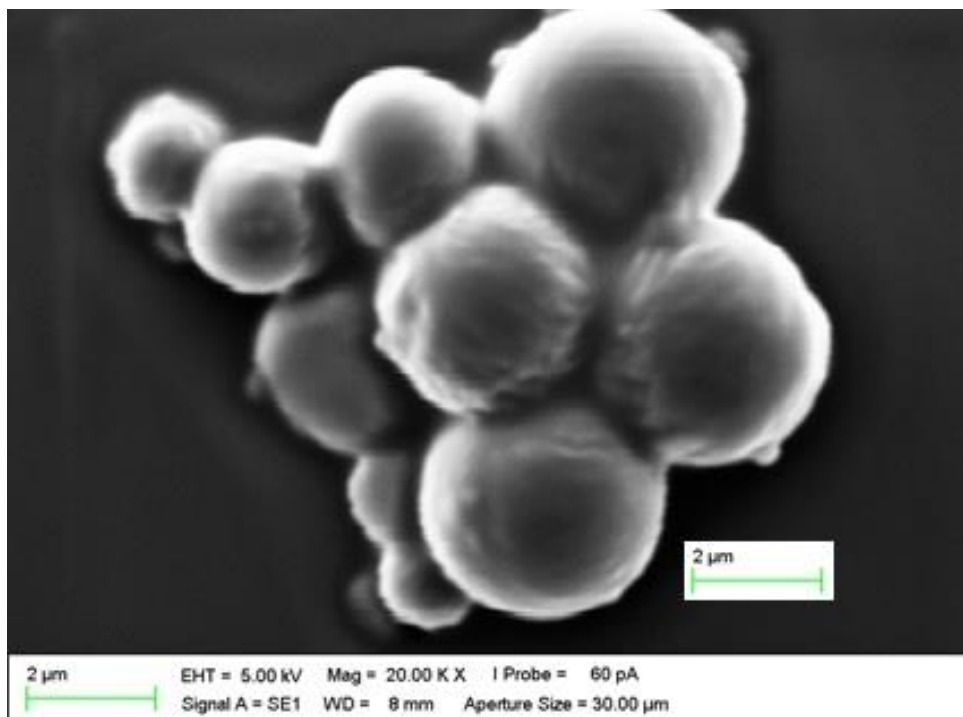


Imagem em 20.000x das micro e nanopartículas do polímero encapsulando o antibiótico

Figura 11:

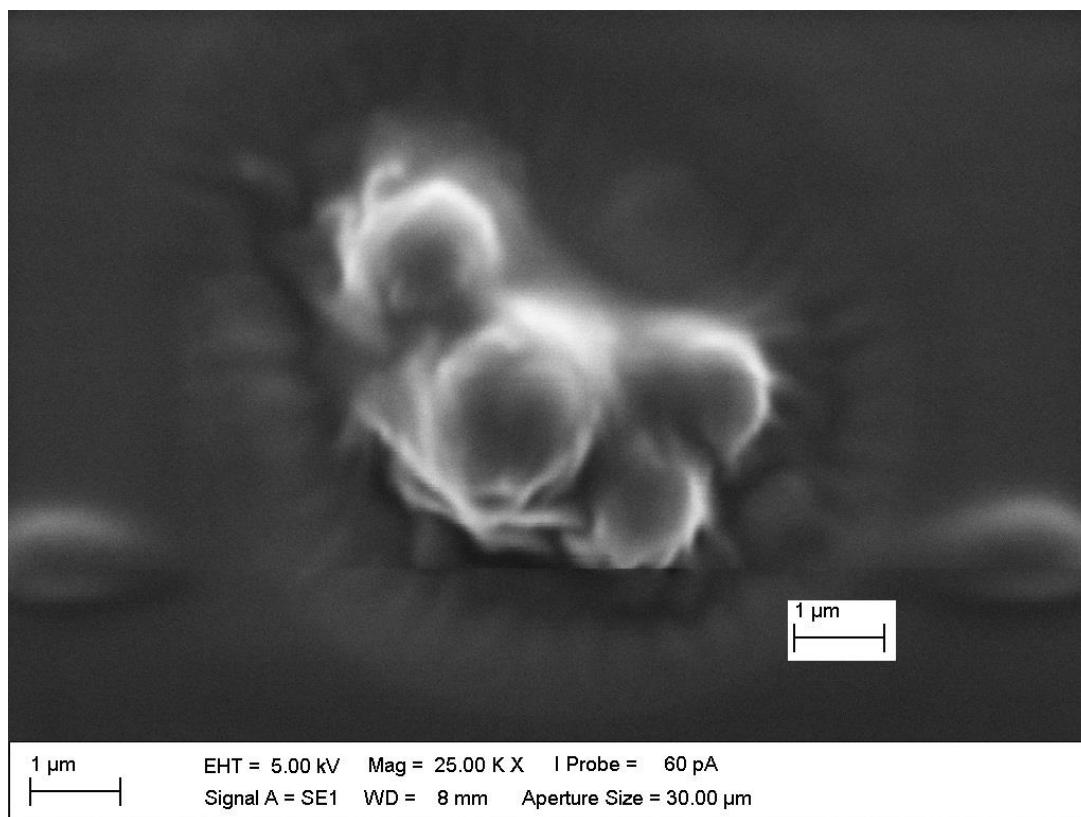


Imagem em 25.000x das micro e nanopartículas do polímero encapsulando o antibiótico.

psulando o antibiótico.

5.3 ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO (FTIR)

Foi realizada a análise do infravermelho nas amostras contendo PCL com o fármaco (Fig. 12) e o branco, polímero não encapsulado (Fig. 13).

Observa-se no espectro IV as absorções de PCL a 1728 cm^{-1} estando relacionado com o alongamento C = O, éster. Os alcanos de estiramento C-H aparecem na faixa de 2926 cm^{-1} e 2868 cm^{-1} . Observa-se em 1472 cm^{-1} C-H deformação por cisalhamento metilenos (CH_2) e 731 cm^{-1} na banda CH_2 de cadeia longa (quando quatro ou mais grupos CH_2 estão presentes na cadeia alifática), características estas do polímero utilizado.

Pode ser notado a grande semelhança entre os dois gráficos, sugerindo que as superfícies destas partículas são revestidas apenas de PCL, enquanto que o fármaco provavelmente está inserido na partícula.

Figura 12:

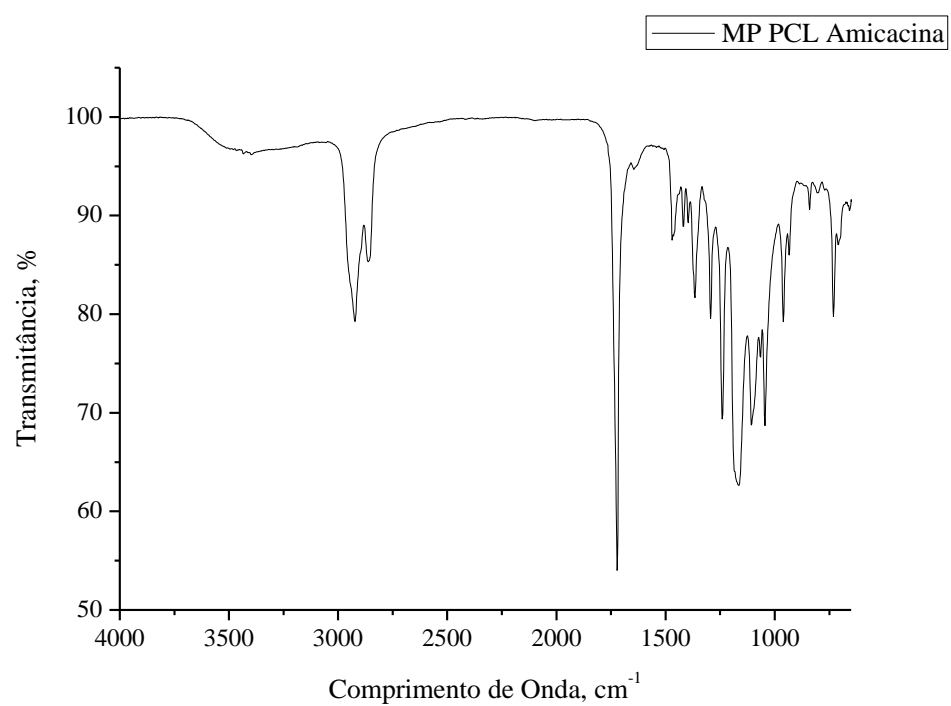


Gráfico Transmitância x Comprimento de onda nas Micropartículas de PCL encapsulando amicacina.

Figura 13:

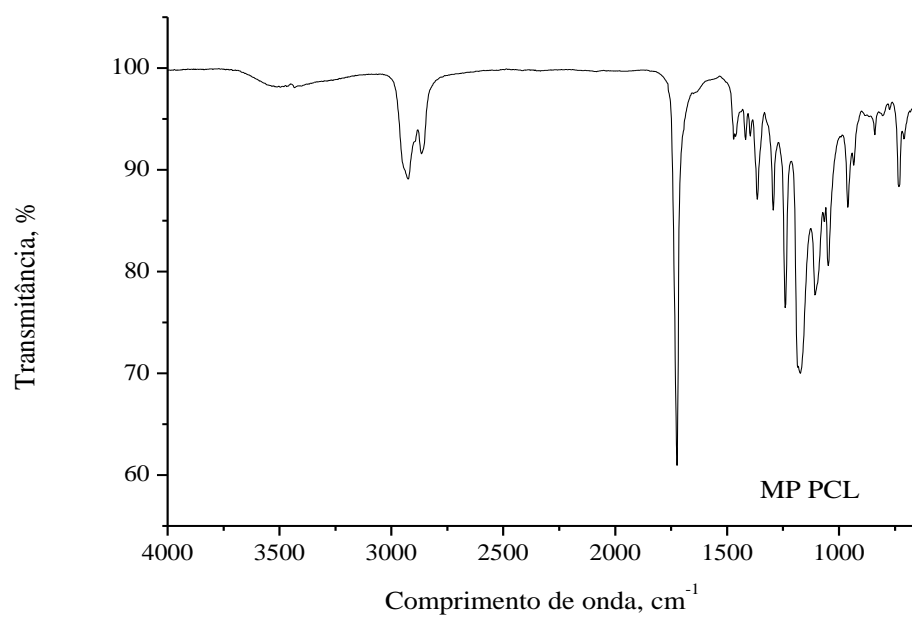


Gráfico Transmitância x Comprimento de onda nas Micropartículas de PCL puras.

5.4 ESPECTROSCOPIA NO ULTRAVIOLETA VISÍVEL (UV-Vis)

Realizado análise do fármaco diluído em água obtivemos seu comprimento de onda correspondente a 204,6 nm (Fig.14), enquanto a solução de PCL microencapsulada indicou espectro de absorção centrada em torno de 281 nm (Fig. 14). Este valor é característico do polímero PCL relacionada com grupos carbonila (C = O). A outra banda de 205 nm, que apareceu junto ao PCL, correspondente a Amicacina (Fig. 14).

Figura 14:

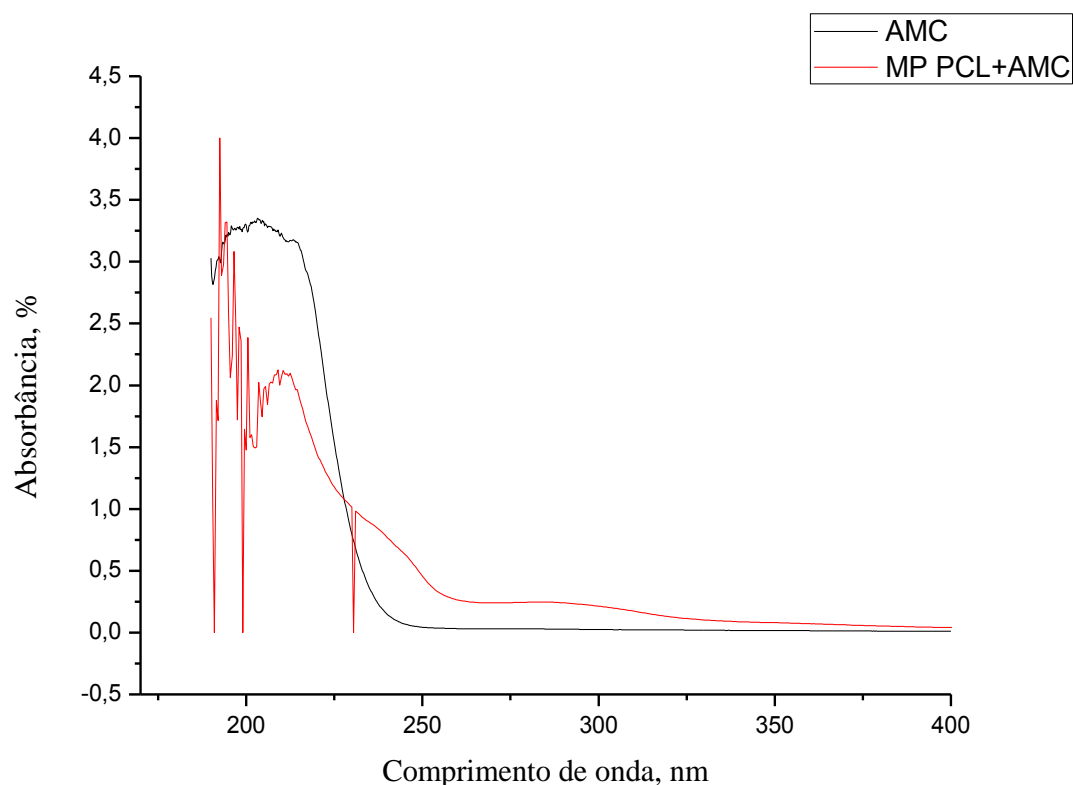


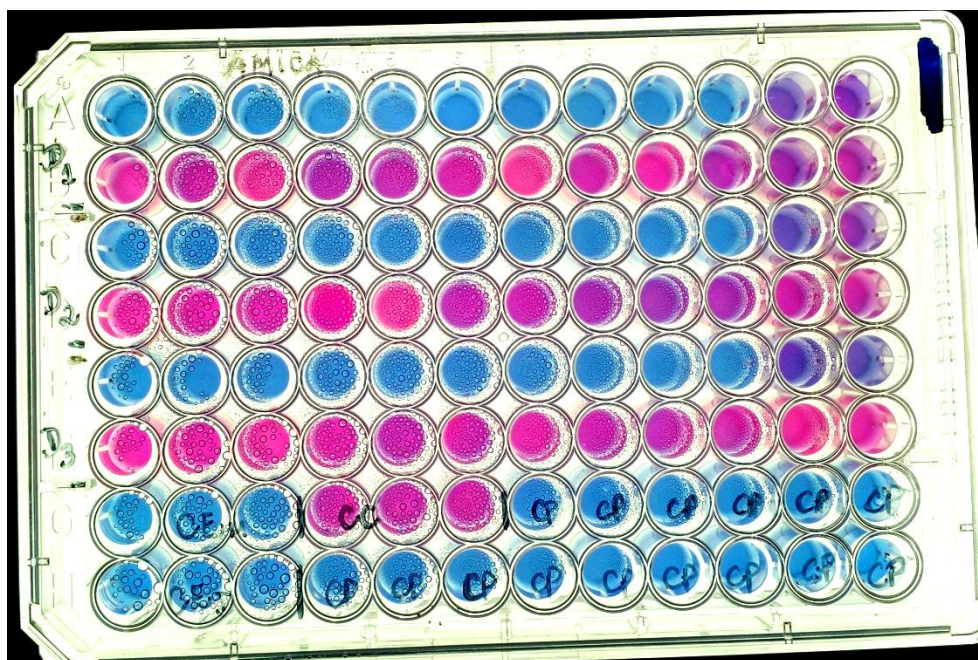
Gráfico Absorbância x Comprimento de onda (nm).

5.5 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

5.5.1 KLEBSIELLA PNEUMONIAE

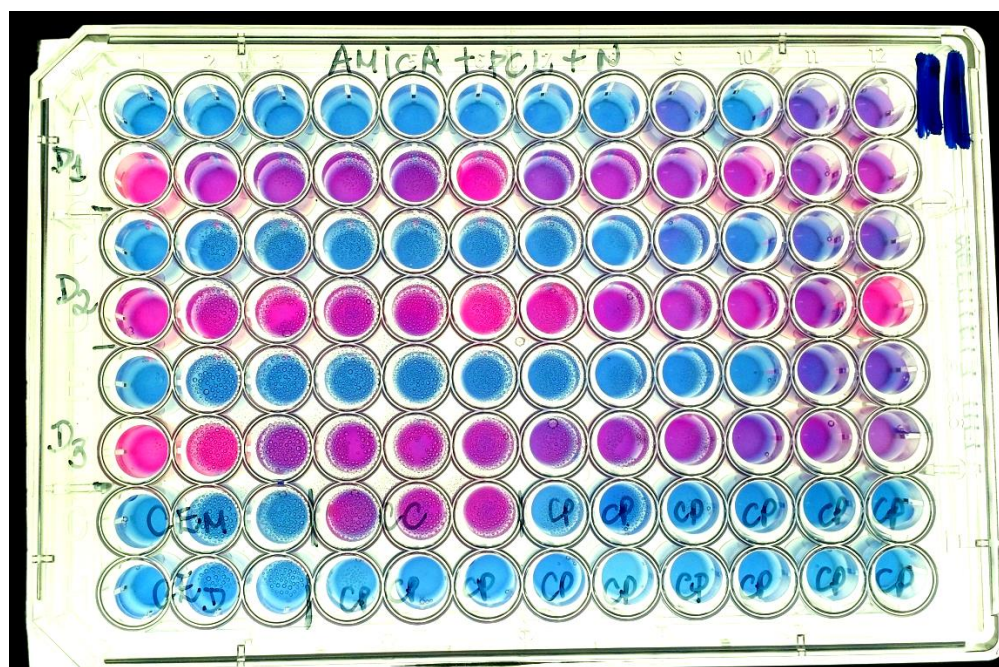
A concentração inibitória mínima (CIM) na amostra de Amicacina encapsulada em PCL com pH ácido (Fig. 15), ocorreu no poço 10, tendo como concentração 0,0078 mg/mL, não havendo diferença para CIM da amostra de Amicacina encapsulada em PCL com pH neutro (Fig. 16). Isto também foi demonstrado através da leitura de percentual de redução do microrganismo (Fig. 17). Para a Amicacina pura (Fig. 17) a CIM foi maior que 0.000489 mg/mL, indicado no poço 15, tendo um percentual de redução de 100% (Fig. 17).

Figura 15:



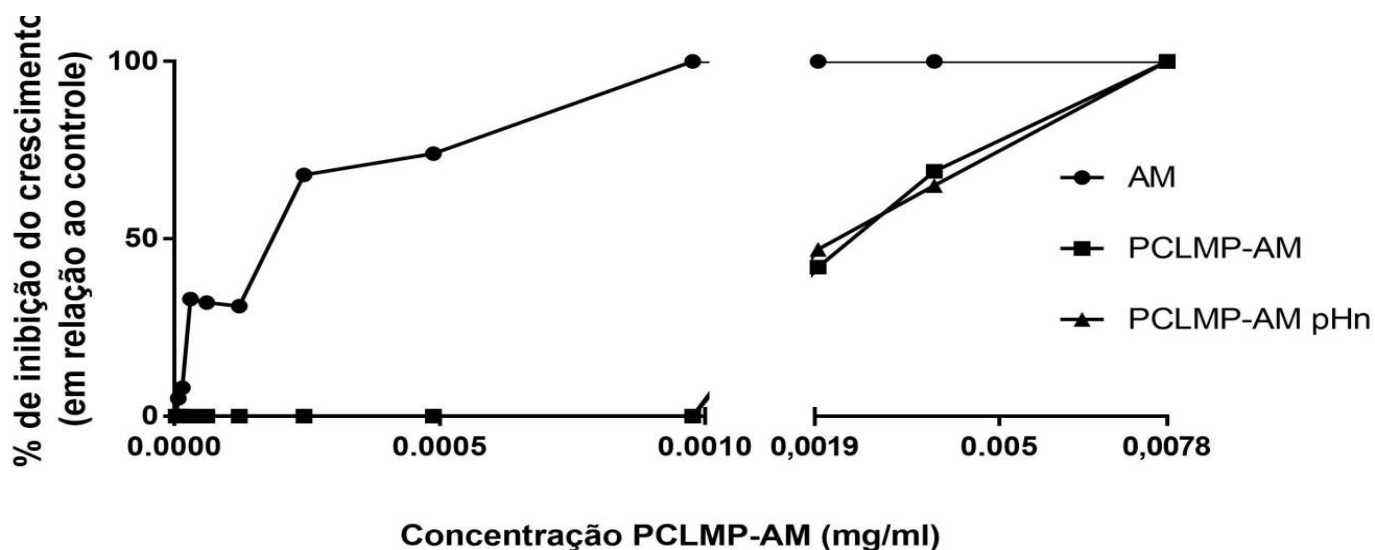
Encapsulamento de Amicacina em PCL com PH Ácido

Figura 16:



Encapsulamento de Amicacina em PCL com PH Neutro

Figura 17:



Percentual de redução da *Klebsiella pneumoniae* frente à Amicacina encapsulada ácida (PCLMP-AM) e neutra (PCLMP-AM pHn) comparando com a amicacina pura (AM).

Os resultados visuais dos testes de difusão atestaram à eficácia antimicrobiana das amostras frente *Klebsiella pneumoniae*. A amicacina foi aplicada ao teste como controle positivo a fim de comparar a viabilidade do microrganismo cultivado. Para o controle negativo, foi utilizado o solvente Dicloroetano, utilizado no ensaio, onde não houve formação dos halos de inibição (Figuras 10 e 11). Os resultados dos testes de difusão em ágar se encontram ilustrados na (Tabela 1).

Figura 10:

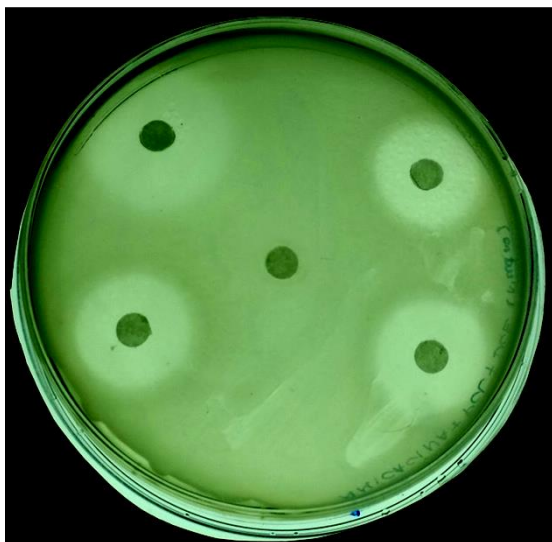


Figura 11:



Tab Encapsulamento de Amicacina em PCL com pH Ácido Encapsulamento de Amicacina em PCL com pH Neutro

Amostras	media do diametro dos halos (mm)
Amicacina em PCL com pH neutro	19,27
Amicacina em PCL com pH ácido	19,40
Amicacina	25,91
Controle Negativo	0

Média do diâmetro dos halos dos testes de difusão

5.5.2 *Pseudomonas aeruginosa*

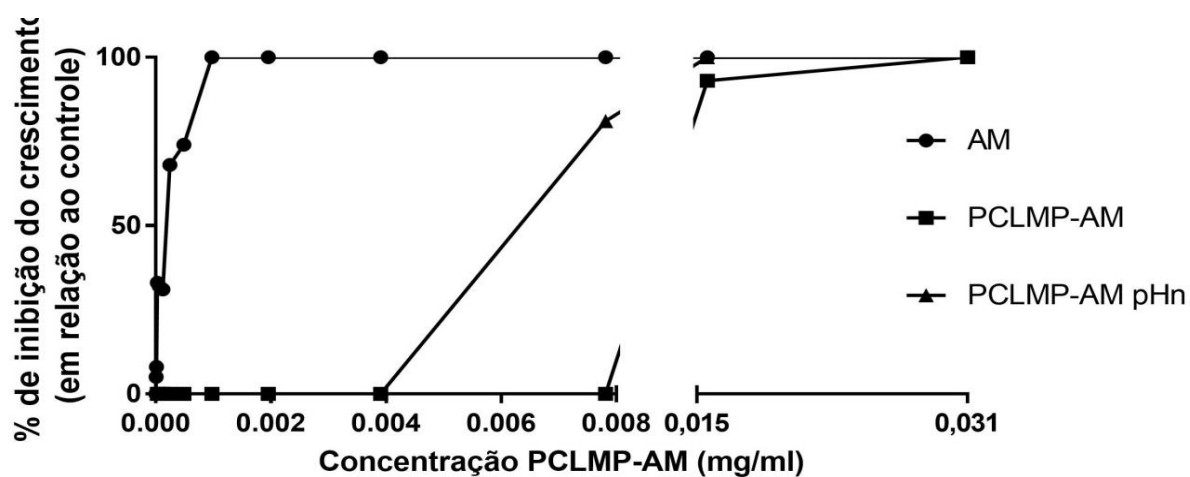
A concentração inibitória mínima (CIM) na amostra de Amicacina encapsulada em PCL com pH ácido (Figura 12), ocorreu no poço 10, tendo como concentração 0,031mg/mL, havendo diferença para a droga em Ph neutro, que ocorreu no poço 9, tendo como concentração 0,015mg/ml (Figura 12), também demonstrado através da leitura de percentual de redução do microrganismo (Figura 13). Para a Amicacina pura a CIM foi maior que 0,002mg/ML, indicada no poço 16, tendo um percentual de redução de 100%.

Figura 12:



Encapsulamento de Amicacina em PCL com PH Ácido e Neutro

Figura 13:



Percentual de redução da *Pseudomonas aeruginosa* frente à Amicacina encapsulada ácida (PCLMP-AM) e neutra (PCLMP-AM pHn) comparando com a Amicacina pura (AM).

Os resultados visuais dos testes de difusão atestaram à eficácia antimicrobiana das amostras frente *Pseudomonas aeruginosa*. A Amicacina foi aplicada ao teste como controle positivo a fim de comparar a viabilidade do microrganismo cultivado. Para o controle negativo, foi utilizado o solvente

Dicloroetano, utilizado no ensaio, onde não houve formação dos halos de inibição (Figuras 14 e 15). Os resultados dos testes de difusão em ágar se encontram ilustrados na (Tabela 2).

Figura



Encapsulamento de Amicacina em PCL
com pH Ácido

14:

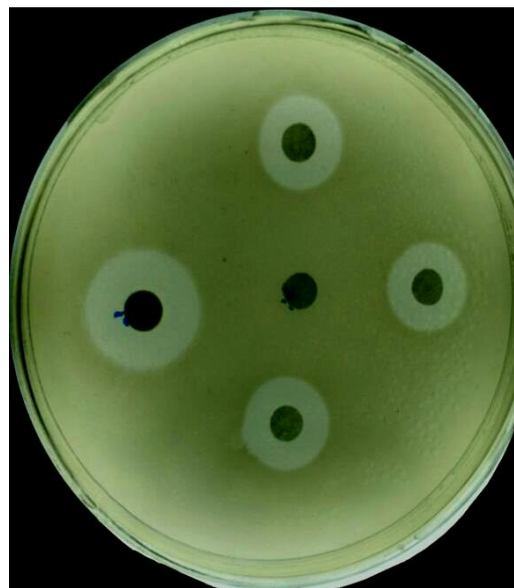


Figura 15:

Encapsulamento de Amicacina em PCL
com Ph Neutro

Tabela 2:

Amostras	Média do diâmetro dos halos (mm)
Ampicacina em PCL com pH neutro	14,4
Ampicacina em PCL com pH ácido	15,2
Ampicacina	17,4
Controle Negativo	0

Média do diâmetro dos halos dos testes de difusão

6. DISCUSSÃO

Recentemente, o sistema de liberação de fármacos relacionados com as nano/micropartículas está sendo relatados como sendo excepcionalmente útil para a terapêutica. Características como uma melhor hidrofília, biodisponibilidade, liberação controlada e melhor efetividade terapêutica geralmente são relatadas como fatores positivos dessa associação. Além disso, há uma diminuição nos níveis de toxicidade em comparação com as drogas isoladas. (KALITA et al., 2015; VARSHOSAZ et al., 2010) O presente estudo demonstrou a possibilidade de produzir novos materiais em microescala com potencial para utilização em várias áreas do campo biológico.

O aumento na prevalência na resistência de cepas de *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* já é um problema de saúde mundial e que vem aumentando a cada ano. (CHLEBICKI; OH, 2004) Novas alternativas, como a associação de nano/micropartículas e nano/microencapsulamento estão sendo utilizadas para tentar minimizar este problema.

KALITA et al., 2015 em um estudo *in vitro*, realizaram o nanoencapsulamento do antimicrobiano clorafenicol com PCL (policaprolactona), com o objetivo de avaliar sua efetividade bactericida e potencial de liberação lenta frente a *Staphylococcus aureus* MRSA (metilicina-resistente). Os autores concluíram que o clorafenicol nanoencapsulado com PCL apresentou uma boa atividade antimicrobiana frente as cepas de *Staphylococcus aureus* MRSA, além disso, foi observado uma diminuição significativa nos níveis de toxicidade da droga nanoencapsulada em comparação com o clorafenicol isolado (KALITA et al., 2015). Em nosso trabalho o potencial antimicrobiano da amicacina microencapsulada com PCL foi bastante satisfatório, ainda que, levemente inferior que a droga pura.

KHODIR ET AL (2013) em um estudo *in vitro* utilizaram o cloridrato de tetraciclina associada ao PCL para avaliar a toxicidade e o grau de liberação da droga com o objetivo de posteriormente utilizar na manutenção do tratamento periodontal. Os autores observaram uma liberação rápida da droga (70%) nos

momentos iniciais, seguida de uma liberação lenta durante 24 horas, uma diminuição da citotoxicidade também foi observada no mesmo estudo. Os testes de liberação da droga e citotóxicidade serão realizados posteriormente nos próximos ensaios do estudo.

VEERAPPAN et al (2014) realizaram um estudo microbiológico *in vitro* utilizando nanopartículas de ouro associadas com o antimicrobiano amicacina. Esse estudo foi realizado frente a cepas de *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, dentre outros microrganismos. Foi utilizado o teste de disco difusão para identificação da concentração mínima inibitória (CIM) e os resultados foram comparados entre a droga pura e carregada com nanopartículas de ouro. (VEERAPPAN; SENTHILKUMAR, 2014) A amicacina associada à nanopartícula de ouro mostrou resultados mais satisfatórios em comparação a droga pura. Outros estudos, utilizando antimicrobianos carregados com nanopartículas de prata também conseguiram demonstrar resultados semelhantes em relação a atividade antimicrobiana e potencial de diminuição da citotoxicidade (JAIN et al., 2009; MARTINEZ-GUTIERREZ et al., 2010; SHAHVERDI et al., 2007) No presente trabalho, foram utilizados os testes microbiológicos de disco difusão e microdiluição em caldo, assim como os trabalhos supracitados.

O teste de difusão em ágar nos proporciona uma análise qualitativa da sensibilidade bacteriana frente ao produto testado. O diâmetro do halo de inibição do crescimento bacteriano é proporcional à capacidade de difusão do material (BORTOLETTO et al., 2005). Neste trabalho, o teste de disco difusão mostrou resultados semelhantes aos da microdiluição em caldo, onde a amicacina encapsulada mostrou resultados semelhantes. Em ambos os testes microbiológicos, foram utilizadas soluções ácidas e neutralizadas da droga encapsulada com PCL, porém obtendo resultados semelhantes no potencial de inibição entre eles.

GHAFFARI et al. (2009) utilizaram o nanopartículas sintetizadas a partir do colesterol, associadas com amicacina e avaliaram sua eficácia frente a cepas de *Pseudomonas aeruginosa*. Como resultado, foi observado que CIM da droga carregada com as nanopartículas lipídicas foi duas vezes menor comparada a CIM da droga isolada. Os autores concluíram que a utilização da amicacina carregada com

nanopartículas apresentam melhor resultado visto que uma menores doses do medicamento podem ser efetivos contra infecções de *Pseudomonas aeruginosa*, além de possuírem menos efeitos adversos e serem mais seguras (GHAFARI et al., 2011). Os testes citotóxicos da amicacina encapsulada com PCL em nosso estudo serão realizados em futuros ensaios afim de determinar a citotoxicidade desta.

ANSARI et al. (2012) realizaram um estudo utilizando nanopartículas de ZnO frente a cepas de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*. Foram realizados testes microbiológicos, incluindo a poço difusão, para determinar a CIM e a CBM (Concentração Bactericida mínima). Os autores concluíram que houve considerável inibição de crescimento das cepas de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*, demonstrando que a associação entre o medicamento e as nanopartículas foi eficiente (ANSARI et al., 2012). O aumento da concentração da amicacina carregada com nanocapsulas de policianoacrilato em comparação a droga pura foi observada em outro estudo (LOSA et al., 1991).

7. CONCLUSÕES

- A síntese dos encapsulados foi realizada com sucesso, tendo média de diâmetro de aproximadamente 2.016 μm .
- Na espectroscopia em região de infravermelho foi constatado semelhança entre os alcanos de estiramento C-H nas amostras encapsuladas e polímero puro, aparecendo na faixa de 2926 cm^{-1} e 2868 cm^{-1} , sugerindo que o fármaco esteja inserido na partícula, enquanto a superfície é revestida por PCL.
- Na espectroscopia no ultravioleta visível UV/VIS, obteve como comprimento de onda de 204,6nm para o fármaco puro, enquanto que a solução encapsulada obteve absorção centrada em torno de 281nm, sendo característica do polímero.
- A análise da atividade antimicrobiana, *in vitro*, demonstrou que a CIM da Amicacina microencapsulada em pH neutro e ácido frente a *Klebsiella pneumoniae* não tiveram diferenças, ocorrendo na concentração de 0,0078 mg/ml. Em contrapartida, os microencapsulados em pH ácido frente as *Pseudomonas aeruginosa*, foram mais efetivos que os neutros, tendo sua CIM na concentração de 0,031mg/ml contra 0,015mg/ml, respectivamente.
- A droga pura obteve sua CIM na concentração de 0.000489 mg/ml na *Klebsiella pneumoniae*, enquanto que nas *Pseudomonas aeruginosas* sua CIM foi maior que 0,002mg/ml.
- Nos testes de disco difusão frente à *Klebsiella pneumoniae*, os encapsulados neutros e ácidos obtiveram, respectivamente, médias de diâmetro de halos em 19.27mm e 19.40mm, enquanto o fármaco puro 25.91mm. Para as *Pseudomonas aeruginosas* os encapsulados neutros e ácidos obtiveram médias de 14.4mm e 15.2mm, respectivamente, enquanto o fármaco obteve 17.4mm.

- Novos estudos são necessários para que esses resultados se tornem viáveis na prática clínica.

REFERÊNCIAS

- AHAMED, M.; ALSALHI, M. S.; SIDDIQUI, M. K. J. Silver nanoparticle applications and human health. **Clinica Chimica Acta**, v. 411, n. 23, p. 1841–1848, 2010.
- ANDRADE, E. D. **Terapêutica Medicamentosa em Odontologia**. 3ª Edição ed. São Paulo - SP: [s.n.].
- ANSARI, M. A. et al. Synthesis and characterization of the antibacterial potential of ZnO nanoparticles against extended-spectrum β -lactamases-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from a tertiary care hospital of North India. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 94, n. 2, p. 467–477, 9 abr. 2012.
- ASSIS, L. M. DE et al. Revisão: características de nanopartículas e potenciais aplicações em alimentos. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 15, n. 2, p. 99–109, 2012.
- AUTO, H. J. DE F.; CONSTANT, A.; CONSTAT, J. M. C. **Antibióticos E Quimioterápicos**. 5ª Edição ed. Maceió: [s.n.].
- AVENT, M. L. et al. Current use of aminoglycosides: indications, pharmacokinetics and monitoring for toxicity. **Internal Medicine Journal**, v. 41, n. 6, p. 441–449, jun. 2011.
- BATISTA, S. A. et al. Oral changes in patients of intensive care units. **Revista Brasileira de Odontologia**, v. 71, n. 2, p. 156–159, 2014.
- BERGAMASCO, M. D. et al. Infection with *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing *K. pneumoniae* in solid organ transplantation. **Transplant Infectious Disease**, v. 14, n. 2, p. 198–205, abr. 2012.
- BROWN, S. P.; CORNFORTH, D. M.; MIDEO, N. Evolution of virulence in opportunistic pathogens: generalism, plasticity, and control. **Trends in Microbiology**, v. 20, n. 7, p. 336–342, 2012.
- BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman**. 12 ed ed. São Paulo - SP: AMGH Editora, 2012.
- BULCÃO, R. P. et al. Acute and Subchronic Toxicity Evaluation of Poly(ϵ -Caprolactone) Lipid-Core Nanocapsules in Rats. **Toxicological Sciences**, v. 132, n. 1, p. 162–176, mar. 2013.
- CASTANHEIRA, M. et al. Epidemiology and carbapenem resistance mechanisms of

carbapenem-non-susceptible *Pseudomonas aeruginosa* collected during 2009-11 in 14 European and Mediterranean countries. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, n. 7, p. 1804–1814, 1 jul. 2014.

CHATTERJEE, M. et al. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and alternative therapeutic options. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 306, n. 1, p. 48–58, 2016.

CHLEBICKI, M.; OH, H. Extended-spectrum Beta-lactamases in Clinical Isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. in a Singapore Hospital: Clinical Spectrum. **Annals Academy of Medicine**, v. 33, n. 1, p. 302–306, 2004.

DE OLIVEIRA, A. A. et al. Persistence of the otoprotective effect. How long does otoprotection against amikacin lasts? **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 78, n. 6, p. 47–50, nov. 2012.

DE OLIVEIRA, R.; MARUYAMA, S. Controle de infecção hospitalar: histórico e papel do estado. **Revista Eletrônica de Enfermagem**, v. 10, n. 3, p. 775–83, 2008.

DESCHAGHT, P. et al. PCR and the detection of *Pseudomonas aeruginosa* in respiratory samples of CF patients. A literature review. **Journal of Cystic Fibrosis**, v. 10, n. 5, p. 293–297, 2011.

DÍAZ Q, P. et al. Resistencia a gentamicina, amikacina y ciprofloxacina en cepas hospitalarias de *Klebsiella pneumoniae* subespecie *pneumoniae* productoras de β -lactamasas de espectro extendido. **Revista médica de Chile**, v. 132, n. 10, p. 1173–1178, out. 2004.

DRAWZ, S. M.; BONOMO, R. A. Three decades of beta-lactamase inhibitors. **Clinical microbiology reviews**, v. 23, n. 1, p. 160–201, jan. 2010.

FIGUERAL, A.; FARIAS, M. G. *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase: A PROBLEM WITHOUT SOLUTION? **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research -BJSCR**, v. 9, n. 1, p. 45–48, 2014.

FREITAS, R. B. et al. INFECÇÕES DO TRATO URINÁRIO DE ORIGEM HOSPITALAR E COMUNITÁRIA: revisão dos principais micro-organismos causadores e perfil de susceptibilidade. **Revista Científica FAGOC - Saúde**, v. 1, n. 1, p. 55–62, 2016.

FREIXO, L. **Micro e nanoencapsulação como estratégias de estabilização de entidades bioativas: proteínas, enzimas e bacteriófagos**. [s.l.: s.n.].

GHAFFARI, S. et al. Stability and antimicrobial effect of amikacin-loaded solid lipid nanoparticles. **International journal of nanomedicine**, v. 6, p. 35–43, 2011.

- GILJOHANN, D. A. et al. Gold Nanoparticles for Biology and Medicine. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 49, n. 19, p. 3280–3294, 26 abr. 2010.
- GUZMAN, M.; DILLE, J.; GODET, S. Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles against gram-positive and gram-negative bacteria. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 8, n. 1, p. 37–45, 2012.
- JAFARI, S. M. et al. Nano-particle encapsulation of fish oil by spray drying. **Food Research International**, v. 41, n. 2, p. 172–183, 2008.
- JAIN, J. et al. Silver Nanoparticles in Therapeutics: Development of an Antimicrobial Gel Formulation for Topical Use. **Molecular Pharmaceutics**, v. 6, n. 5, p. 1388–1401, 5 out. 2009.
- JENKINS, A. et al. Amikacin use and therapeutic drug monitoring in adults: do dose regimens and drug exposures affect either outcome or adverse events? A systematic review. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, p. dkw250, 2016a.
- JENKINS, A. et al. Amikacin use and therapeutic drug monitoring in adults: do dose regimens and drug exposures affect either outcome or adverse events? A systematic review. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 71, n. 10, p. 2754–2759, out. 2016b.
- KALITA, S. et al. Chloramphenicol encapsulated in poly- ϵ -caprolactone-pluronic composite: nanoparticles for treatment of MRSA-infected burn wounds. **International journal of nanomedicine**, v. 10, n. 1, p. 2971–84, 15 jan. 2015.
- KARA, A. et al. Amikacin induced renal damage and the role of the antioxidants on neonatal rats. **Renal Failure**, v. 38, n. 5, p. 671–677, 27 maio 2016.
- KHODIR, W. W. A. et al. Trapping tetracycline-loaded nanoparticles into polycaprolactone fiber networks for periodontal regeneration therapy. **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**, v. 28, n. 3, p. 258–273, 1 maio 2013.
- KOCYIGIT, I. et al. Preventing amikacin related ototoxicity with N-acetylcysteine in patients undergoing peritoneal dialysis. **European Archives of Oto-Rhino-Laryngology**, v. 272, n. 10, p. 2611–2620, 30 out. 2015.
- LEIS, J. A.; RUTKA, J. A.; GOLD, W. L. Aminoglycoside-induced ototoxicity. **CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne**, v. 187, n. 1, p. E52, 6 jan. 2015.
- LIMA, A. B. M. et al. Pseudomonas spp. ISOLATED FROM THE ORAL CAVITY OF HEALTHCARE WORKERS FROM AN ONCOLOGY HOSPITAL IN MIDWESTERN BRAZIL. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 57, n. 6, p.

513–514, dez. 2015.

LINKOV, I.; SATTERSTROM, F. K.; COREY, L. M. **Nanotoxicology and nanomedicine: making hard decisions** **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**. [s.l.: s.n.].

LOSA, C. et al. Improvement of Ocular Penetration of Amikacin Sulphate by Association to Poly(butylcyanoacrylate) Nanoparticles. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 43, n. 8, p. 548–552, ago. 1991.

LOVE, S. A. et al. Assessing Nanoparticle Toxicity. **Annual Review of Analytical Chemistry**, v. 5, n. 1, p. 181–205, 19 jul. 2012.

LU, Q. et al. Pseudomonas aeruginosa serotypes in nosocomial pneumonia: prevalence and clinical outcomes. **Critical Care**, v. 18, n. 1, p. R17, 2014.

MARSOT, A. et al. Amikacin in Critically Ill Patients: A Review of Population Pharmacokinetic Studies. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 56, n. 2, p. 127–138, 21 fev. 2016.

MARTINEZ-GUTIERREZ, F. et al. Synthesis, characterization, and evaluation of antimicrobial and cytotoxic effect of silver and titanium nanoparticles.

Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, v. 6, n. 5, p. 681–688, out. 2010.

MARTINS, W. M. B. DA S. **Estudo dos mecanismos de resistência e virulência em isolados de Klebsiella pneumoniae produtores de carbapenemase**. [s.l.] Fundação Oswaldo Cruz, 2014.

MILLAN, L. S. et al. Infecções de corrente sanguínea por bactérias multirresistentes em UTI de tratamento de queimados: experiência de 4 anos. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**, v. 27, n. 3, p. 374–378, set. 2012.

MODONGO, C. et al. Amikacin Concentrations Predictive of Ototoxicity in Multidrug-Resistant Tuberculosis Patients. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 59, n. 10, p. 6337–43, out. 2015.

MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 385, n. 1, p. 113–142, 2010.

MORITZ, M.; MALGORZATA, G.-M. Recent Developments in the Application of Polymeric Nanoparticles as Drug Carriers. **Adv Clin Exp Med**, v. 24, n. 5, p. 749–758, 2015.

MULLER, A. et al. Appropriateness of aminoglycoside prescriptions in a French

university hospital. **Médecine et Maladies Infectieuses**, v. 46, n. 6, p. 308–313, 2016.

MUNOZ-PRICE, L. S. et al. Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 13, n. 9, p. 785–796, 2013.

OLIVEIRA, J. F. P.; CIPULLO, J. P.; BURDMANN, E. A. Nefrotoxicidade dos aminoglicosídeos. **Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular**, v. 21, n. 4, p. 444–452, dez. 2006.

OLIVEIRA, L. C. F. et al. A REGULAÇÃO DA NANOTECNOLOGIA NOS EUA: UM ESTUDO DAS REGRAS APLICADAS AOS NANOMEDICAMENTOS. **Sempesq**, v. 0, n. 16, 2014.

OLIVEIRA, I. L. M. DE et al. Antimicrobianos de uso odontológico: informação para uma boa prática. **Odontologia Clínico-Científica (Online)**, v. 10, n. 3, p. 217–220, 2011.

OTT, E. et al. The Prevalence of Nosocomial and Community Acquired Infections in a University Hospital An Observational Study. **Deutsches Ärzteblatt International**, v. 110, n. 31, p. 533–40, 2013.

PADRÃO, M. et al. Prevalência de infecções hospitalares em unidade de terapia intensiva* Prevalence of nosocomial infection in intensive care unit. **Rev Bras Clin Med**, v. 8, n. 2, p. 125–8, 2010.

PATERSON, D. L.; BONOMO, R. A. Extended-Spectrum β -Lactamases: a Clinical Update. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 18, n. 4, p. 657–686, 1 out. 2005.

POULIKAKOS, P.; FALAGAS, M. E. Aminoglycoside therapy in infectious diseases. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 14, n. 12, p. 1585–1597, 8 ago. 2013.

PRABHU, S.; POULOSE, E. K. Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects. **International Nano Letters**, v. 2, n. 1, p. 32, 2012.

SAHOO, S. K.; PARVEEN, S.; PANDA, J. J. The present and future of nanotechnology in human health care. **Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine**, v. 3, n. 1, p. 20–31, 1 mar. 2007.

SANCHEZ, G. V. et al. *Klebsiella pneumoniae* antimicrobial drug resistance, United States, 1998-2010. **Emerging Infectious Diseases**, v. 19, n. 1, p. 133–136, 2013.

SEVERINO, P. et al. Polímeros Usados como Sistemas de Transporte de Princípios Ativos Polymers for Drug Delivery Systems Formulations. **Polímeros**, v. 21, n. 5, p.

361–368, 2011.

SHAHVERDI, A. R. et al. Synthesis and effect of silver nanoparticles on the antibacterial activity of different antibiotics against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 3, n. 2, p. 168–171, jun. 2007.

SILVA FILHO, L. V. R. F. DA et al. *Pseudomonas aeruginosa* infection in patients with cystic fibrosis: scientific evidence regarding clinical impact, diagnosis, and treatment. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 39, n. 4, p. 495–512, jun. 2013.

SOUSA, A.; PEREIRA, M. *Pseudomonas aeruginosa* Diversification during Infection Development in Cystic Fibrosis Lungs—A Review. **Pathogens**, v. 3, n. 3, p. 680–703, 18 ago. 2014.

SYDNOR, E. R. M.; PERL, T. M. Hospital epidemiology and infection control in acute-care settings. **Clinical microbiology reviews**, v. 24, n. 1, p. 141–73, jan. 2011.

THAKKAR, K. N.; MHATRE, S. S.; PARIKH, R. Y. Biological synthesis of metallic nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 6, n. 2, p. 257–262, 2010.

TUMBARELLO, M. et al. Infections caused by KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*: differences in therapy and mortality in a multicentre study. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 70, n. 7, p. 2133–2143, jul. 2015.

VALLIM, P. et al. FASCIÍTE NECROSANTE EM REGIÃO CERVICOFACIAL: RELATO DE CASO NECROTIZING FASCIITIS IN FACIAL CERVICAL REGION: CASE REPORT. **Rev.Odontol. Univ. Cid. São Paulo**, v. 28, n. 2, p. 143–7, 2016.

VARSHOSAZ, J. et al. Development and optimization of solid lipid nanoparticles of amikacin by central composite design. **Journal of Liposome Research**, v. 20, n. 2, p. 97–104, 23 jun. 2010.

VEERAPPAN, S.; SENTHILKUMAR, K. Efficacy of Amikacin Coated Gold Nanoparticles on Bacterial Pathogens Isolated from Environment. **Advanced Science, Engineering and Medicine**, v. 6, n. 10, p. 1092–1099, 2014.

VELISSARIS, D. et al. Pharmacokinetic changes and dosing modification of aminoglycosides in critically ill obese patients: a literature review. **Journal of clinical medicine research**, v. 6, n. 4, p. 227–33, ago. 2014.

XIE, J.; TALASKA, A. E. New developments in aminoglycoside therapy and ototoxicity. **Hearing Research**, v. 281, n. 1, p. 28–37, 2011.